
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Les Microbes dans l'industrie fromagère

PAR P. MAZÉ

TROISIÈME PARTIE

LES FERMENTS DE LA CASÉINE

I

En principe, on peut admettre que les ferments capables de se développer dans le lait solubilisent la caséine et sécrètent par conséquent de la caséase. Les matières albuminoïdes du lait ne peuvent pas contribuer à la nutrition azotée des bactéries sans être préalablement digérées; mais cette digestion est plus ou moins apparente suivant les quantités de diastase mises en jeu, et suivant aussi la réaction produite par la culture.

Les ferments qui dédoublent le sucre de lait en acides lactique ou acétique arrivent à paralyser l'action de leur caséase au point que la caséine, coagulée par les acides, demeure en apparence complètement inattaquée. Si on s'arrange de façon à saturer les acides à mesure qu'ils se forment, l'action de la caséase est facile à mettre en évidence. C'est ainsi que M. de Freudenreich a montré que les ferments lactiques digèrent la caséine du lait additionné de carbonate de calcium. Cette action empêchante des acides se manifeste d'ailleurs vis-à-vis des ferments et diastases de toutes les substances albuminoïdes, comme l'ont montré MM. Tissier et Martelly dans leurs recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie.

Aussi bien, l'acidité ne paralyse complètement l'action de la

caséase que lorsqu'elle atteint un taux relativement élevé; on sait que la trypsine agit encore en présence de 2 à 3 grammes d'acide acétique par litre.

On conçoit cependant que pour une même quantité de caséase sécrétée, les ferments qui n'acidifient pas le lait digèrent plus rapidement la caséine. Ces ferments n'attaquent pas le lactose, ou, s'ils l'attaquent, ils le brûlent complètement; ils ne forment pas d'acide aux dépens des matières azotées; parmi ces ferments, on trouve quelques espèces de tyrothrix étudiés par Duclaux; les moisissures, les oïdiums, les mycodermes appartiennent aussi à cette catégorie.

Enfin, si les bactéries productrices de caséase sont capables d'alcaliniser le lait par la formation d'ammoniaque, la solubilisation de la caséine devient très rapide; l'ammoniaque, on le sait, exerce par elle-même une action dissolvante, de sorte que son influence s'ajoute à celle de la caséase, favorisée aussi par l'alcalinité du milieu. Quelques tyrothrix de Duclaux se rangent dans ce groupe.

Toutes ces nombreuses espèces de ferments peuvent exister dans les fromages, et le plus souvent elles s'y développent réellement. Si on ne les considère que dans leurs rapports avec la caséine, il faut donc s'attendre déjà à un concours inextricable d'actions parallèles ou opposées, qu'il semble *a priori* bien difficile de démêler. Le résultat le plus clair de ces considérations, c'est qu'il ne faut négliger, au point de vue de la production de la caséase, aucune des espèces présentes dans les fromages, à quelque classe qu'elle appartienne.

II

RECHERCHE DES ESPÈCES QUI PRÉSENTENT A L'AFFINAGE DES FROMAGES

Lorsqu'on se propose de découvrir les espèces qui jouent un rôle actif dans la solubilisation de la caséine, il est tout indiqué de les rechercher dans l'enduit glaireux qui recouvre la surface des fromages et que l'on désigne dans le brie, le camembert, etc., sous le nom de « rouge ». On voit, en effet, que la digestion de la caséine commence par les régions qui sont en contact immédiat avec le « rouge », pour se propager peu à peu vers le centre.

Mais lorsqu'on cultive dans le lait les espèces prédominantes qui contribuent à former le rouge, on s'aperçoit immédiatement qu'elles ne produisent que des quantités insignifiantes de caséase. Elles mettent plusieurs mois pour solubiliser la caséine du lait à la température de 30°. Dans le camembert on trouve pourtant une espèce assez active, car au bout de 8 à 10 jours, elle produit une solubilisation apparente de la caséine, à une température de 20-22°; mais elle ne saurait être comparée aux espèces que l'on est convenu d'appeler ferments de la caséine, lesquels sont capables de solubiliser cette substance au bout de 24 à 48 heures dans un tube de culture.

Lorsqu'on s'adresse à des fromages de mauvaise qualité, il n'est pas rare de trouver des ferments très actifs vis-à-vis de la caséine. J'ai à peine besoin de faire remarquer que j'ai retenu seulement les ferments isolés des fromages de choix que je dois à l'obligeance de MM. Baudoin, mandataires aux Halles; ces ferments seuls sont intéressants; mais comme ils sont trop peu actifs pour expliquer les faits d'observation, il faut chercher ailleurs les agents de l'affinage de la pâte.

III

ACTION DES CHAMPIGNONS SUR LA CASÉINE

L'action des champignons sur la caséine, à commencer par les moisissures, va nous fournir des renseignements intéressants.

Duclaux a montré, le premier, que les moisissures sécrètent aussi de la caséase. Les *Penicillium*, en particulier, solubilisent la caséine assez rapidement. Le *P. candidum*, ensemencé sur du lait écrémé, forme un voile très épais; au début, son influence sur la caséine est peu marquée; puis au bout d'une quinzaine de jours, à la température ordinaire, la solubilisation de la caséine devient très rapide; la réaction du milieu, qui était demeurée jusque-là à peu près neutre, devient très alcaline; le liquide complètement transparent dégage une forte odeur d'ammoniaque. C'est donc la production abondante d'ammoniaque qui a contribué à la solubilisation rapide et complète de la caséine. Le champignon a d'abord emprunté son carbone au sucre de

lait, puis, lorsque tout le sucre a été absorbé, c'est la caséine restante qui est devenue la source d'azote et de carbone; mais comme les champignons sont des organismes de combustion extrêmement actifs, le carbone de la caséine est rapidement oxydé; l'azote en excès est éliminé à l'état d'ammoniaque. Le liquide devient alcalin au point de tuer la moisissure; les réensemencements sont impossibles au bout de quelques semaines, alors que dans un milieu neutre les spores se conservent des années.

Le *Penicillium glaucum* solubilise plus rapidement la caséine que le *P. candidum*, qui est lui-même beaucoup plus actif que le *P. album*, c'est pour cette raison que cette dernière espèce convient mieux pour le fromage de choix que le *P. candidum*.

Les oïdiums et les mycodermes agissent de la même façon sur la caséine, mais moins énergiquement que les *Penicillium*.

Lorsqu'on ensemence du lait écrémé avec un des microorganismes précédents associé au ferment lactique, la marche des phénomènes n'est plus la même. Les cultures sont très abondantes, mais tant qu'il reste du lactose, il se forme de l'acide lactique; la solubilisation de la caséine ne se produit, dans ces conditions, que lorsque tout l'acide lactique a disparu. A partir de ce moment, elle se fait avec une extrême rapidité et le résultat final est le même.

Dans ces cultures on peut suivre, dans les moindres détails, le mode d'action de la caséase. Que le milieu soit neutre ou acide, ce sont toujours les régions les plus voisines de la surface qui sont atteintes; la caséase se fixe sur la caséine, comme la trypsine sur l'albumine; le phénomène est très net en présence du ferment lactique; le coagulum est attaqué sur quelques millimètres d'épaisseur et comme la solubilisation est extrêmement lente, la caséase reste fixée sur la caséine qui prend peu à peu un aspect translucide. Tant que la caséine n'est pas solubilisée, la diastase ne peut pas diffuser dans le coagulum, bien qu'elle soit sécrétée en grande quantité par le voile mycélien, qui atteint une très grande épaisseur.

Il semble aussi que la sécrétion de caséase soit très minime chez les ferments lactiques, car ces microbes ne parviennent pas à modifier l'aspect du coagulum.

On peut cependant montrer qu'elle n'est pas négligeable en

associant le ferment lactique à un mycoderme. Cultivé sur du lait écrémé, le mycoderme seul ne solubilise par la caséine, du moins sensiblement; en présence du ferment lactique, la solubilisation est complète; mais la marche du phénomène est lente; il faut donc attribuer ce résultat à la diastase sécrétée par les ferments lactiques, laquelle devient active dans un milieu neutre ou faiblement alcalin.

Parmi ces résultats, deux faits importants sont à retenir : la fixation de la caséase par la caséine insoluble et la possibilité de produire la solubilisation de la caséine par la diastase sécrétée par les ferments lactiques, fait déjà établi, comme je l'ai appelé, par M. de Freudenreich.

IV

MÉCANISME DE LA MATURATION DES FROMAGES A PÂTE MOLLE

Je rappelle que les ferments qui constituent le « rouge » ne prennent qu'une part très faible à la solubilisation de la caséine par action diastasique. Les organismes de la surface, qu'ils appartiennent à la classe des champignons ou à celle des bactéries, ne doivent pas sécréter de quantités sensibles de caséase. Il arrive assez fréquemment qu'il se glisse parmi eux des espèces actives. On voit alors la caséine se liquéfier complètement, dans les régions qui sont en contact immédiat avec les végétations superficielles, si bien que la croûte du fromage se sépare facilement de la pâte. Lorsque cet accident se produit, le fromage est de qualité médiocre; les spécimens de choix ne possèdent pas ce défaut; leur pâte présente une consistance homogène et assez résistante, si bien que lorsqu'on exerce avec le doigt une pression suffisante dans le voisinage d'une section, il se forme un bourrelet régulier et unique, ayant pour diamètre l'épaisseur même du fromage. Il y a plus, la pâte présente une certaine élasticité; c'est ce qui fait dire aux praticiens qu'elle rappelle le caoutchouc, ce qui ne l'empêche pas de « fondre » rapidement dans la bouche.

La liquéfaction trop avancée des couches superficielles doit être attribuée à la fixation de la caséase par la caséine insoluble; si par conséquent il se forme trop de diastase dans ces régions,

elle s'accumule sur place et ne peut attaquer les parties sous-jacentes sans être préalablement libérée par la solubilisation des parties qui l'ont retenue.

Ceci revient à dire que la maturation de la pâte ne se fait pas sous l'influence de la caséase sécrétée par les ferments du rouge, puisque cette diastase ne peut pas diffuser dans l'épaisseur de la pâte; elle est due à la présence, dans toute la masse du caillé, d'une diastase produite par les ferments qui se sont développés à l'intérieur même du caillé. Parmi ces espèces, ce sont évidemment les ferments lactiques qui prédominent, et comme ils produisent aussi de la caséase, il faut reconnaître que ce sont eux qui président encore à l'affinage des fromages. On les trouve d'ailleurs aussi abondamment dans les fromages mûrs que dans le caillé acide, et ce fait ne doit pas nous étonner, puisque les milieux neutres ou faiblement alcalins sont ceux qui leur conviennent le mieux.

Ainsi, contrairement aux apparences, la solubilisation partielle de la caséine se fait localement par une diastase répartie également dans toute sa masse. Mais il est certain, d'autre part, qu'elle commence par les régions superficielles pour se propager lentement vers les parties profondes. C'est là un fait général que je n'ai pas l'intention de contester; mais il s'explique simplement de la façon suivante : l'affinage des fromages à pâte molle se fait en milieu neutre ou faiblement alcalin; l'alcalinisation commence par la surface sous l'influence de l'ammoniaque toujours présente dans les caves, et quand le « rouge » s'est développé, il devient une source de production d'ammoniaque; celle-ci peut pénétrer dans la pâte et la neutraliser progressivement. Sous l'influence de ce changement de réaction, la caséase entre en activité et accomplit son œuvre, de l'extérieur vers l'intérieur, parallèlement au travail de neutralisation qui se produit dans le fromage.

Dans les variétés de fromage qui sont dépourvus de végétation cryptogamique, appartenant au groupe des *Penicillium*, la marche de l'affinage est la même; on s'arrange de façon à provoquer la formation d'une flore bactérienne capable de produire des quantités assez élevées d'ammoniaque. Ce résultat s'obtient en frottant tous les jours la surface des fromagss avec de l'eau salée, à partir du moment où il est suffisamment égoutté et

séché. On évite ainsi le développement des moisissures et, de plus, on maintient la porosité des couches superficielles, condition indispensable pour permettre au sel et à l'ammoniaque de pénétrer dans la masse. On dit même que pour mieux assurer le succès de ces manipulations, on s'adresse parfois à des sources plus ou moins avouables de carbonate d'ammoniaque. Cette pratique, si elle a été réellement exploitée, peut être avantageusement remplacée par l'emploi de solutions artificielles de carbonate d'ammoniaque.

La caractéristique de ces fromages, c'est de posséder une saveur amère et piquante; ce résultat est dû à la présence de sels ammoniacaux et à une dégradation trop avancée de la caséine. Dans la pratique on s'attache, autant que possible, à éviter une production trop abondante d'acide lactique en employant du lait frais. Les rares ferments lactiques apportés par le lait sont emprisonnés dans le caillé et ne peuvent pas l'envahir complètement. La pâte est moins acide, de sorte qu'il se forme dans la suite peu de lactate d'ammoniaque.

Dans les fromages pressés, aussi bien que dans les fromages à pâte cuite, la pâte reste acide; l'affinage se fait en milieu faiblement acide; il est dû encore aux ferments lactiques, d'après les observations de M. de Freudenreich sur l'emmenthal. La persistance de la réaction acide rend la maturation beaucoup plus lente, bien qu'elle se fasse à une température plus élevée que celle du brie et du camembert, par exemple. On conçoit qu'une acidité trop élevée rendrait impossible la solubilisation de la caséine, aussi les praticiens s'attachent-ils à exprimer le plus complètement possible le petit-lait du caillé. Si on négligeait cette précaution, on n'obtiendrait que des produits médiocres.

Si on neutralise en partie l'acidité du caillé, on active la solubilisation de la caséine, comme l'on montré MM. Lindet, Ammann et Houdet.

Il faut remarquer, du reste, que dans les caves de gruyère, il se forme aussi de petites quantités d'ammoniaque. L'opération du salage, fréquemment répétée pendant le séjour en cave, maintient la croûte constamment humide; cette humidité favorise le développement superficiel d'une flore microbienne très riche, qui produit de l'ammoniaque facile à reconnaître, même

à l'odorat, ainsi que j'ai eu l'occasion de le constater avec M. Houdet. L'influence de cette ammoniacque n'est pourtant pas très visible, puisque la pâte reste acide et que la solubilisation de la caséine, comme M. de Freudenreich l'a constaté, se fait en même temps dans toute l'épaisseur du fromage. Mais on doit admettre qu'elle favorise la solubilisation des couches superficielles, où le travail des bactéries est gêné par la présence du sel qui y pénètre constamment, pour diffuser vers les couches profondes. Cette influence du sel sur l'activité des ferments se traduit par l'absence complète d'ouvertures dans le voisinage de la surface.

V

LES FERMENTS DU ROUGE ET LEUR RÔLE DANS LES FROMAGES

Le rouge n'est pas produit par un ferment unique; il renferme au contraire un nombre respectable d'espèces bactériennes, et il n'y a là rien qui doive nous surprendre. Le lait normal est un excellent aliment pour les bactéries, et ses qualités nutritives sont exaltées encore par la solubilité de la caséine et l'alcalinité du milieu.

On doit donc considérer comme un fait normal la présence d'un nombre considérable d'espèces microbiennes à la surface des fromages en voie de maturation. Elles ne présentent pas toutes la même importance, et si l'on veut choisir les espèces réellement utiles, il faut s'attacher surtout à découvrir les espèces prédominantes non pas dans un fromage, mais dans un grand nombre d'échantillons de provenances diverses, également bien réussis.

En procédant de cette façon, et en s'assurant, par l'emploi de milieux appropriés, qu'on a bien isolé toutes les espèces importantes, on est obligé de retenir encore plusieurs ferments.

On constate ainsi que le rouge se forme avec le concours des bactéries et de l'oxygène de l'air, agissant en milieu alcalin sur les produits de dégradation de la caséine; les moisissures y jouent également un certain rôle; l'oïdium enfin modifie l'aspect de cette couleur qu'il fait virer plutôt vers le jaune orangé. Le rouge est donc susceptible de se modifier suivant l'activité

des facteurs qui participent à sa formation. Il constitue une sorte d'indicateur précieux pour le praticien qui reconnaît, à son aspect, si le fromage se fera bien ou mal, s'il a par conséquent plus ou moins de valeur marchande. C'est tout ce qu'il lui demande.

Nous devons lui réclamer autre chose; j'ai dit qu'il ne doit pas intervenir d'une manière bien sensible dans la production de la caséase qui solubilise la caséine; mais il constitue une source d'ammoniaque dont le rôle est bien marqué dans la maturation de la pâte, et de plus, il préserve le fromage contre les phénomènes d'oxydation, en empêchant l'accès de l'oxygène de l'air.

Le mode de formation de l'ammoniaque, par les ferments du rouge, se rattache au processus que les moisissures mettent en œuvre pour donner naissance au même produit, aux dépens de la caséine, lorsque tout le sucre du lait a disparu. On conçoit ainsi qu'un ferment quelconque puisse donner naissance à de l'ammoniaque sans sécréter de quantités sensibles de caséase.

Mais l'ammoniaque est une arme à double tranchant; il en faut un peu; le moindre excès devient nuisible, car dans ces conditions la solubilisation de la caséine est trop rapide; le fromage peut couler et de plus il acquiert une saveur piquante et souvent amère. Les ferments du rouge ne doivent donc pas produire de grandes quantités d'ammoniaque. Il est inutile d'ajouter qu'ils ne doivent développer ni odeur ni saveur désagréables.

Le rôle de protection vis-à-vis de l'oxygène de l'air n'est pas moins utile ni moins intéressant. Un fromage affiné renferme environ 40 0/0 de son poids sec en matières grasses. On sait avec quelle facilité cette substance s'altère au contact de l'air, en contractant une odeur et une saveur de rance très désagréables. La matière grasse du fromage doit donc être mise à l'abri de l'air pendant toute la durée de la fabrication.

Ce sont d'abord les moisissures et les mycodermes qui se chargent de ce soin; puis, lorsque l'affinage commence, les ferments du « rouge » remplissent le même rôle; on peut dire qu'à travers cette épaisse couche de ferments il ne passe aucune trace d'oxygène. C'est pour cela que la crème ne subit aucune modification dans sa composition, même dans un milieu faiblement alcalin.

VI

CONCLUSIONS THÉORIQUES

En résumé, et conformément à ce que je faisais prévoir dès le début, l'industrie fromagère repose entièrement sur la mise en œuvre de la fermentation lactique et de tous les phénomènes qui l'accompagnent.

Les ferments lactiques sont présents dans le lait dès la traite; à ce moment on leur réclame la formation d'une quantité d'acide lactique, variable avec la nature du fromage que l'on veut obtenir et le genre de manipulations auxquelles on doit les soumettre.

La fermentation lactique élimine ou tout au moins empêche toutes les autres fermentations susceptibles de se déclarer dans le lait; elle facilite l'égouttage spontané ou provoqué du fromage, et elle communique à la caséine et à la crème l'arome si recherché dans les beurres et les fromages.

Lorsque l'affinage commence, ce sont encore les ferments lactiques qui solubilisent une partie de la caséine, et ils doivent prendre à ce travail la plus grande part possible. Il est bien évident que d'autres ferments interviennent également dans le phénomène par la caséase qu'ils produisent ou par l'ammoniaque qu'ils dégagent; mais il faut remarquer qu'un fromage est d'autant meilleur que la participation des ferments ammoniacaux ou des espèces qui produisent beaucoup de caséase est plus réduite.

On sait depuis longtemps que l'acide lactique et l'ammoniaque jouent un rôle important dans l'industrie fromagère, ainsi que le fait remarquer M. Lézé dans son petit opuscule sur la maturation des caillés; mais les meilleurs fromages sont précisément ceux qui ne contiennent, pour ainsi dire, ni acide lactique ni ammoniaque; ce n'est pas que l'acide lactique soit dangereux pour le consommateur; mais l'acide libre ou ses sels ammoniacaux masquent l'arome, si fugace, de la fermentation lactique. L'ammoniaque est nuisible pour la même raison, et aussi parce qu'elle est un produit de désassimilation qui n'est pas toléré par l'organisme. L'ammoniaque absorbée est arrêtée par le foie et transformée directement en urée. Je dois ajouter enfin qu'elle

est nuisible encore parce qu'elle favorise la solubilisation trop complète de la caséine et la formation, par les ferments des matières azotées, de produits toxiques qui peuvent devenir dangereux pour les consommateurs.

Pour toutes ces raisons et sans qu'elle en ait cependant conscience, la clientèle réserve ses préférences aux fromages qui réunissent les qualités que je viens d'énumérer, et parmi eux ce sont le Brie et le Camembert de choix qui tiennent évidemment la tête.

Ce sont ces deux variétés que j'ai surtout étudiées dans le but de définir le rôle des ferments qui interviennent dans leur préparation; tous les résultats que j'ai exposés dans le cours de cette étude ont été confirmés point par point par des applications pratiques.

VII

CONCLUSIONS PRATIQUES

Ces recherches ont été entreprises sur la demande même des industriels, et je dois ici leur adresser tous mes remerciements pour le concours bienveillant qu'ils m'ont toujours prêté, et aussi pour la matière première et le matériel qu'ils ont mis gracieusement à ma disposition. C'est ainsi que MM. Néron et Waldmann, M. Fonty ont facilité ma tâche; je dois remercier particulièrement MM. Guérault-Godard père et fils, dont l'initiative intelligente et persévérante contribuera pour beaucoup à montrer les avantages pratiques que l'industrie fromagère est appelée à retirer de l'emploi des cultures pures de ferments, pour fabriquer des fromages avec du lait pasteurisé.

Il ne suffit pas, en effet, d'établir dans les laboratoires les lois théoriques qui expliquent et reproduisent les résultats qui s'obtiennent dans l'industrie. Il faut encore montrer que les méthodes de laboratoire peuvent donner des résultats sur le terrain industriel, et quand on a obtenu ces résultats, il faut les soumettre à l'approbation d'un juge qui a le droit de se montrer exigeant, puisque c'est lui qui paye, le consommateur.

Toutes ces épreuves ont été faites grâce, je l'ai dit, au concours de MM. Guérault-Godard.

Dans l'espèce, la méthode à employer était tout indiquée :

isoler les ferments utiles et les introduire dans un lait débarrassé, par la pasteurisation, de tous les ferments nuisibles qu'il a recueillis un peu partout.

J'ai montré le rôle des espèces utiles; je n'ai pas besoin d'insister sur celui des espèces nuisibles, celles-ci sont naturellement plus nombreuses que les premières, et c'est à elles qu'il faut attribuer les multiples accidents de la fabrication. Le fromager ne dispose d'aucun moyen efficace pour s'en débarrasser, et s'il lui arrive parfois de désinfecter ses locaux et ses ustensiles, il éprouve les plus grandes difficultés pour réussir la fabrication.

L'introduction de la pasteurisation dans l'industrie laitière permettra de régler désormais la fabrication. On sait, en effet, qu'à 65° les formes végétatives des espèces bactériennes capables de se développer dans le lait sont détruites pour la plupart. Celles qui résistent, c'est-à-dire les espèces dites thermophiles, sont relativement rares dans le lait; les spores ne sont pas détruites non plus, mais un ensemencement copieux de ferments lactiques actifs, pratiqué immédiatement après la pasteurisation, avant ou en même temps que l'addition de présure, empêche le développement des espèces que le chauffage a respectées.

Une fois que le caillé est mis en moule et égoutté, il ne peut plus être infecté que par la surface; mais on a pris, bien entendu, la précaution d'introduire les champignons convenables, de façon à leur permettre de prendre de l'avance sur les spores et les espèces nuisibles apportées par l'air. A partir du moment où le fromage possède son revêtement mycélien, il est à l'abri des contaminations. Il n'y a plus qu'à s'entourer des conditions qui favorisent le développement des ferments du rouge. introduits aussi à l'état de cultures pures, pour obtenir des fromages qui présentent toutes les qualités des produits de choix, et qui ont sur eux l'avantage de se conserver longtemps et de ne jamais couler, même à la température ordinaire des appartements.

On sait, en effet, que les fromages à pâte molle doivent être consommés le plus tôt possible après leur mise en vente. Si les méthodes empiriques peuvent donner de bons résultats, c'est surtout grâce à la basse température des caves d'affinage. Les ferments producteurs d'ammoniaque ou de caséase ne se développent pas à cette température; mais ils sont présents dans le

fromage, et dès qu'on les expose à une température de 45°, qu'ils rencontrent sûrement dans les appartements, ils entrent en activité; leur influence se fait sentir d'autant plus vite que les fromages affinés leur conviennent à merveille, de sorte qu'au bout de quelques heures le fromage n'a plus sa finesse initiale.

Le choix de la température de 65-66° comme température de pasteurisation était tout indiqué, car on sait qu'on peut chauffer le lait à 65°, pendant 5 minutes au moins, sans lui communiquer le goût de cuit, et sans modifier les propriétés de la caséine vis-à-vis de l'action de la présure. Mais il est indispensable qu'aucune portion du lait ne dépasse cette température; les pasteurisateurs dont disposent actuellement les industries laitières ne peuvent pas remplir cette condition. Ce résultat est obtenu en employant comme moyen de chauffage les vapeurs saturantes d'un liquide bouillant à 65-66°, dans un espace clos, sous la pression atmosphérique. On obtient ainsi une température fixe et indéglable quelle que soit la dépense de chaleur dans l'unité de temps.

L'Ammoniaque dans le lait

Recherche et interprétation de sa présence

PAR MM. A. TRILLAT ET SAUTON

La recherche de l'ammoniaque dans le lait et les conclusions que l'on peut en tirer au point de vue analytique, pour caractériser sa pureté, n'ont pas encore fixé l'attention des hygiénistes.

En appliquant au lait la méthode de recherche de l'ammoniaque basée sur la réaction de l'iodure d'azote, réaction qui a été exposée précédemment dans ces *Annales*¹, nous avons reconnu que certains laits mis en circulation donnaient abondamment la coloration noire de l'iodure d'azote caractérisant l'ammoniaque.

Cette remarque a été le point de départ de ce travail : après avoir établi une méthode pour déceler l'ammoniaque dans le lait, nous avons, au moyen de cette méthode, recherché quelques unes des causes de sa formation. Enfin, nous avons appliqué ces résultats pour la caractérisation de la pureté du lait.

Nous résumons dans cette note, suivant cet ordre, l'ensemble de nos observations.

I

Nous avons tout d'abord été amenés à chercher un procédé pratique pour déceler l'ammoniaque dans le lait, les méthodes usuelles, notamment la méthode de Nessler, n'ayant pu être utilisées. Nous faisons observer en outre que la distillation du lait sous pression réduite en présence d'une petite quantité d'alcali, outre la longueur du procédé, présente le danger de donner des traces d'ammoniaque provenant d'un commencement de décomposition de la matière albuminoïde du lait, ainsi qu'il résulte aussi d'un récent travail de MM. Berg et Scherman².

D'autre part, la méthode à l'iodure d'azote qui repose sur l'équation suivante :



qui a été utilisée pour la recherche de l'ammoniaque dans l'eau,

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, avril 1905.

2. *Journal Amer. Chem. Soc.* 1905; 27, p. 124.

n'est pas applicable directement au lait, par suite de l'abondance de la matière albuminoïde qui se combine rapidement avec l'iode, empêchant ainsi la coloration caractéristique de se produire. Mais la réaction se fait si l'on a soin de déféquer préalablement.

Plusieurs façons d'opérer se présentent : on peut précipiter la matière albuminoïde par un acide, filtrer, neutraliser par un alcali très pur et chercher l'ammoniaque dans le filtrat en y ajoutant l'iodure de potassium et de l'hypochlorite de chaux; on peut aussi déféquer au moyen de l'acétate de plomb dont on se débarrasse ensuite en le séparant à l'état d'iodure de plomb, par addition d'iodure de potassium. Cette méthode est assez délicate parce qu'elle exige que la précipitation du sel de plomb soit faite exactement; un excès d'iodure de potassium étant nuisible pour la bonne réussite de la réaction. Enfin, on peut faire l'extrait du lait au bain-marie après l'avoir acidulé par une goutte d'acide chlorhydrique. On épuise cet extrait par l'eau, on filtre et on cherche l'ammoniaque dans le filtrat.

Mais nous préférons la méthode suivante qui est à la fois plus rapide et plus sensible et qui n'est qu'une modification du mode opératoire décrit.

Elle repose sur la propriété que possède le trichlorure d'iode de déféquer instantanément le lait et de provoquer, en présence de traces d'ammoniaque, la formation de l'iodure d'azote lorsqu'on alcalinise le liquide à examiner.

On procède de la manière suivante : on met 10 c. c. de lait dans un tube à essai; on ajoute 10 c. c. d'une solution de trichlorure d'iode à 10 0/0¹. La défécation est instantanée; on ajoute peu à peu dans le filtrat un lait de chaux pure (2 à 3 parties de chaux pour 100 d'eau) jusqu'à apparition d'un précipité noir provenant de la formation de l'iodure d'azote qui disparaît par un excès de réactif. Cette méthode permet facilement de déceler l'ammoniaque à la dose de 1/100,000 et de l'évaluer approximativement par un procédé colorimétrique en se servant de types de comparaison. Nous faisons observer que dans la saturation du filtrat, il est nécessaire d'employer la chaux comme

¹ 1. Le trichlorure d'iode se trouve dans le commerce. La solution aqueuse à 10 0/0 se décompose lentement, nous conseillons de la renouveler souvent.

agent de neutralisation. La soude ou la potasse contiennent très souvent des traces de sels ammoniacaux.

Après avoir vérifié et contrôlé la méthode sur des laits additionnés ou non d'ammoniaque, nous l'avons utilisée comme il suit.

II

Nous avons d'abord constaté que les laits frais provenant de vaches saines et traités avec soin n'ont pas fourni la réaction de l'ammoniaque. Ces expériences ont été faites sur des laits de vaches de diverses races, prélevés dans les environs de Paris. Ces mêmes laits, examinés au moment de leur coagulation, n'ont pas donné non plus la réaction de l'ammoniaque.

Ces notions étant acquises, pour rechercher sous quelles influences la présence de l'ammoniaque se manifestait, nous avonsensemencé des laits purs avec divers germes et nous avons examiné dans quelles conditions il y avait apparition d'ammoniaque. Des ensemencements étaient pratiqués sur 20 c. c. de lait, dans des flacons stérilisés que l'on plaçait à l'étuve à 35°. Après un nombre d'heures variable, on recherchait l'ammoniaque dans le lait jusqu'au moment où la coagulation était bien manifeste.

L'acidité du lait était dosée parallèlement à l'ammoniaque : comme celle-ci se trouve à l'état de sel, il était intéressant, comme question accessoire se rattachant à notre travail, de se rendre compte si la détermination de l'acidité libre du lait, dans la pratique courante, pouvait en subir une influence ; en d'autres termes, nous avons cherché à nous rendre compte si l'ammoniaque était en assez grande quantité pour saturer une fraction importante de l'acidité du lait.

Les essais ont porté non seulement sur des laits crus naturels ou étendus, mais aussi sur les mêmes laits stérilisés.

Comme germes, on a expérimenté les principaux ferments du lait, des bacilles pathogènes comme le bacille typhique, le *B. coli commune*, le *B. anthracis*, etc..., le *micrococcus ureæ* comme ferment ammoniacal, enfin quelques tyrothrix comme espèce coagulante et peptonisante, et le bacille de Flügge (V) que l'on trouve souvent dans le lait et qui est une espèce également peptonisante.

Ce choix est évidemment très incomplet, mais il nous a paru suffisant pour le point de vue limité auquel nous nous sommes placés.

TABLEAU I

GERMES N'AYANT PAS PROVOQUÉ L'APPARITION DE L'AMMONIAQUE
DANS LE LAIT

A. Essai sur un lait stérilisé non étendu.

(L'acidité est exprimée en soude déci-normale. Acidité initiale :

1^{cc},3 de NaOH $\frac{N}{10}$ pour 10 c. c. de lait avec la phtalcine comme indicateur.)

Observations après,	Témoin.		Lait aigri.		B. typhique.		B. coli commune		B. anthracis.		B. tuberculeux		Vibrion cholérique.	
	Acidité sur 10 ^{cc} . de lait.	AzH ₃ par litre de lait.	Acidité sur 10 c. c. lait.	AzH ₃ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ₃ par litre.
4 heures.	1.3	0	1.3	0	1.3	0	1.3	0	1.3	0	1.3	0	1.3	0
8 —	1.3	0	2	0	1.3	0	1.5	0	1.5	0	1.4	0	1.8	0
16 —	1.3	0	3.5	0	1.3	0	3	0	1.5	0	1.5	0	3.5	0
24 —	1.3	0	4.2	0	1.3	0	4	0	1.5	0	1.5	0		0
36 —	1.3	0	5	0	1.3	0	4.5	0	1.5	0	1.6	0		0
72 —	1.3	0	7.4	0	1.3	0	6.2	0	3.1	0	1.6	0		0

La stérilisation du lait pouvant avoir une influence retardatrice sur le développement des germes, nous avons expérimenté aussi sur des laits crus : l'apparition de l'ammoniaque ne s'est pas davantage manifestée, comme l'indique le tableau suivant (Tableau II) :

TABLEAU II

B. Ensemencements sur des laits crus.

(Acidité initiale 1cc,3 de soude déci-normale pour 10 c. c. de lait
avec la phtaléine comme indicateur.)

Observations après.	Témoin.		Lait aigri.		B. typhique.		B. coli commune.		B. tuberculeux.	
	Acidité sur 10 c. c. de lait.	Ammo- niacque par litre de lait.	Acidité sur 10 c. c.	Ammo- niacque par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité sur 10 c. c.	AzH ³ par litre.
4 heures.	1.3	0	1.9	0	1.3	0	1.3	0	1.4	0
8 —	1.8	0	3.2	0	1.8	0	1.5	0	1.1	0
16 —	3	0	4.5	0	3	0	4.2	0	4.7	0
24 —	4.2	0	8.4	0	4.2	0	5	0	5.8	0
36 —	5	0	9.5	0	5.1	0	5.2	0	6.8	0
72 —	6	0	?	0	6	0	8.5	0	7.5	0

Les mêmes essais ont été faits en opérant sur des laits étendus à 5 fois leur volume, les résultats obtenus ont été encore négatifs pour ce qui concerne l'ammoniacque.

Par contre, les laitsensemencés par les germes suivants ont donné la réaction de l'ammoniacque qui a pu être évaluée à partir d'un certain moment. (Tableau III).

TABLEAU III

EXEMPLE DE LAITS ENSEMENCÉS PAR DES GERMES QUI ONT PROVOQUÉ
LA FORMATION DE L'AMMONIAQUE

A. *Essais sur des laits stérilisés non étendus.*

(Acidité initiale du lait : 1 c. c. de soude déci-normale pour 10 c. c. de lait avec la phtaléine comme indicateur, l'ammoniaque est exprimée en milligrammes.)

Observations après.	Témoïn.		Micrococc. ureæ.		Tyrothrix tenuis.		Tyrothrix filiformis.		B. Flügge V.		Eau d'égout.		Jus de viande décomposée.		Urine putréfiée.	
heures	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ₃ par litre.
4	1	0	1		1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
8	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1,3	0	1	0	1	0
16	1	0	1	traces	1,5	0	1,5	0	1,5	0	2,9	0	1,3	0	1	0
24	1	0	1,3	25	1,8	0	2,2	0	2	0	3,3	16	1,8	20	1,3	20
36	1	0	5,6	33	4,6	20	5	20	4,8	20	6,4	25	4,3	22	2,3	22
72	1	0	9	50	5,9	25	6,3	25	6	25	12	30	6,2	25	4,5	33

Le même lait que précédemment, stérilisé et étendu à 5 fois son volume d'eau distillée, a donné des résultats plus accentués. (Tableau 4).

TABLEAU IV

B. Essais sur le même lait que précédemment, étendu à 5 fois son volume d'eau.

Même acidité initiale.

Observation après. heures	Témoin.		Micrococcus ureæ.		Tyrothrix tenuis.		Tyrothrix filiformis.		B. Flügge V.		Eau d'égout.		Jus de viande décomposée.		Urine putréfiée.	
	Acidité pour 40 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 40 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.
4	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
8	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1,5	0	1,5	0	1,5	0
16	1	0	1,5	traces	2,9	traces	3	0	2,9	0	3	18	3	traces	3,2	0
24	1	0	1,7	25	3,5	20	3,7	18	3,5	18	3,9	22	3,3	20	3,9	0
36	1	0	5,9	50	4,6	20	5,1	25	4,8	22	9,8	25	7,1	25	5	traces
72	1	0	11	100	6,3	22	7	25	6,6	22	13	33	8,6	33	6,9	20

Afin de nous rendre compte si, dans les laits naturels non stérilisés, la formation de l'ammoniaque pouvait être influencée par le développement simultané des autres germes, nous avons fait les essais suivants qui démontrent que la production d'ammoniaque a eu lieu parallèlement. (Tableau V.)

TABLEAU V

ESSAIS SUR DES LAITS NATURELS NON STÉRILISÉS ET NON ÉTENDUS

(Acidité initiale du lait : 1 c. c. de soude déci-normale pour 10 c. c. de lait).

Observations après.	Témoïn.		Micrococ. ureæ.		Tyrothrix tenuis.		Tyrothrix filiformis.		B. de Flügge V.		Eau d'égout.		Jus de viande décomposé.		Urine putréfiée.	
	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.	Acidité pour 10 c. c.	AzH ³ par litre.
heures																
4	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
8	1.5	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
16	3	0	3	traces	1.8	0	1.9	0	1.8	traces	2.7	0	2.6	traces	3	traces
24	5	0	3	33	2.3	0	2.5	traces	2.5	traces	4.5	29	3.0	25	3.7	33
36	4	0	8.1	50	2.6	0	6.3	29	5.9	20	9.4	25	7.9	33	4.6	40
72	6	0	9.2	100	5.8	20	7.1	25	6.9	25	13	33	9	50	6.6	100

Deux facteurs influent sur la rapidité de la formation de l'ammoniaque dans les laitsensemencés examinés jusqu'au moment de leur coagulation : ce sont la température et l'importance de l'ensemencement. Nous avons observé que lorsque l'ensemencement était pratiqué au fil de platine, les laits maintenus à une température de 15-20° se coagulaient bien avant l'apparition de l'ammoniaque, contrairement à ce qui se passait pour les mêmes laits chauffés à 35°.

Mais si l'ensemencement était pratiqué largement, le lait fournissait abondamment la réaction de l'ammoniaque. C'est cette remarque qui nous a permis de tirer un parti de la méthode pour l'examen de la pureté d'un lait.

III

Il était à prévoir, à la suite de cette remarque, que les laits additionnés d'eau malpropre ou ayant été traités ou conservés

dans des conditions défectueuses de propreté devaient fournir directement la réaction de l'ammoniaque. C'est ce que nous avons vérifié en additionnant un lait pur de 10 0/0 d'eau de Seine : l'apparition de l'ammoniaque s'est manifestée bien avant la coagulation et elle atteint souvent 20 à 25 milligrammes par litre. De même les laitsensemencés par de l'eau d'égout (2 gouttes par litre) ont donné la réaction de l'ammoniaque à froid avant la coagulation. La présence de l'ammoniaque peut donc être considérée comme un indice de pollution : cette opinion a été en outre confirmée par l'analyse de laits prélevés par le laboratoire municipal de Paris qui avaient donné la réaction ammoniacale : ces laits avaient été manifestement mouillés.

D'autres causes, d'origine non microbienne, peuvent encore expliquer la présence de l'ammoniaque dans le lait, telles sont par exemple la traite du lait effectuée dans une étable mal aérée et remplie de vapeurs ammoniacales, le dépôt du lait dans des récipients y ayant séjourné, la sueur tombant accidentellement dans le lait, etc. Dans ces cas, la présence de l'ammoniaque est encore un indice d'un manque de soin dans le courant des manipulations.

En dehors de la question de la pureté du lait, il reste à examiner si la présence de l'ammoniaque dans un lait exerce une influence sur la détermination de son acidité. On a vu que la quantité d'ammoniaque que certains laits peuvent contenir avant leur coagulation pouvait atteindre 20 à 25 milligrammes par litre, ce qui correspond à une saturation de 132 milligrammes d'acide lactique. Ces quantités ne sont pas négligeables, et, dans l'étude de l'acidité du lait, il y aura donc lieu d'en tenir compte.

En résumé, les conclusions qui se dégagent de notre travail sont que le lait de vache saine, traité dans des conditions suffisantes de propreté, dans une étable bien aérée, ne devrait pas contenir de l'ammoniaque. L'absence de l'ammoniaque n'est évidemment pas une preuve que le lait ne soit pas contaminé, mais sa présence, surtout si elle est abondante, doit être à notre avis considérée, non pas comme une certitude, mais comme une présomption de pollution et de mouillage. A ce titre, notre procédé analytique pourra donc rendre service pour s'assurer de la pureté parfaite d'un lait.

Sur la division nucléaire de la levure pressée

PAR M. SWELLENGREBEL, D'AMSTERDAM.

Avec la planche XV.

I

HISTORIQUE

La plupart des auteurs qui ont étudié le sujet affirment maintenant que la cellule des levures possède un noyau, mais ne sont pas encore d'accord sur le mode de division.

Comme on le sait, M. Schmitz (30) est le premier qui ait coloré ces noyaux, il les démontra dans les cellules en les fixant à l'acide picrique et en les colorant à l'hématéine ammoniacale. Ses résultats ne s'accordaient pas avec ceux de M. Brücke, qui, avant l'apparition du mémoire de M. Schmitz, avait nié l'existence d'un noyau dans les levures (2).

Plus tard ont paru plusieurs mémoires, les uns affirmant l'existence d'un noyau, les autres la niant. Dans son *Botanisches Praktikum* de 1884, M. Strasburger accepte l'existence d'un noyau ; celle-ci est aussi admise par MM. Hansen (12), Zacharias (34), Zalewski (35), Zimmerman (36), Schleiden (29) et Nägeli (37), Dangeard (42) ; cependant M. Zimmerman semble rester un peu sceptique à ce sujet. Il pense qu'il serait bien possible qu'on eût pris des corpuscules, qui se trouvent en grande quantité dans des levures, pour des noyaux. Contrairement à ces auteurs, M. Krasser (19) nie l'existence d'un noyau. M. Hieronymus (14) a décrit une pelote de granules dans les cellules de levure, mais il ne croit pas que cette pelote soit un noyau ; cependant, Anna Stecksén (28) a vu une pelote semblable se divisant en deux parties quand la cellule commençait à bourgeonner ; l'une des deux allait dans la cellule fille. M. Macallum (39) nie également l'existence du noyau.

M. Raum (25), qui a donné dans son mémoire un résumé de la bibliographie jusqu'à 1891, a repris l'objection de M. Zimmerman. Il remarque que MM. Schmitz, Zalewski et Zacharias ont coloré à l'hématoxyline, après avoir laissé leurs préparations pendant quelque temps dans l'alcool ; or, par cette méthode, les

corpuscules se colorent vivement, et il croit avoir le droit d'affirmer que le noyau de ces auteurs n'était autre chose que des agglomérations de corpuscules; les petits corps qu'il a trouvés lui-même dans les cellules, il ne les prend pas pour des noyaux mais pour des corpuscules. M. Roncali, qui a vu aussi ces granules, semble être du même avis (27). M. Eisenschitz (6) pense que les cellules de la levure possèdent déjà une vacuole, avant que la substance chromatique ne se soit encore réunie en noyau, Enfin M. Curtis (5), qui a vu aussi des granules chromatiques dans les cellules du parasite d'une saccharomycose humaine, ne semble pas avoir pu observer un noyau réel.

Contrairement aux affirmations de M. Raum, M. Möller (23), au moyen d'une technique toute nouvelle, a démontré des noyaux dans les levures et en a donné des microphotographies très convaincantes; dans un autre mémoire (24), il adopte un procédé nouveau au moyen duquel il obtient des résultats meilleurs encore; il nie l'existence d'une membrane nucléaire et d'un nucléole, il ne voit que la division amitotique. M. Janssens (17) conclut aussi à l'existence d'un noyau, il pense que les corpuscules de M. Raum ne sont que les nodules des alvéoles du protoplasme. De plus, il affirme que la division du noyau est une vraie mitose, il a cru voir l'apparence de fuseau et, dans les cellules sporulantes, les stades mono-aster et di-aster; le fuseau peut être éloigné d'une assez grande distance de la place où la cellule va bourgeonner. MM. Maffuci et Sirleo (21) ont pu confirmer les résultats de M. Janssens : ils ont vu une karyokinèse dans les cellules de levure des tumeurs humaines, la même constatation a été faite aussi par M. Marpmann (22). MM. Janssens et Leblanc proposent une nouvelle manière de considérer le noyau : ayant remarqué que le noyau est très souvent entouré d'une auréole achromatique, ils considèrent la partie chromatique centrale comme le nucléole, la partie achromatique comme le noyau lui-même. M. Wager (33) a une opinion un peu différente de celle de MM. Janssens et Leblanc. Pour lui le noyau est composé d'une vacuole et d'une partie chromatique, le nucléole est situé à côté de la vacuole, et celle-ci contient un réseau chromatique. La division s'accomplit amitotiquement dans l'isthme qui unit la cellule fille à la cellule mère, rarement tout à fait dans la cellule mère.

Quelques auteurs ont fait des objections à cette manière de voir. M. Hoffmeister (16) affirme l'existence d'un noyau, mais le réseau chromatique que M. Wager a cru voir dans la vacuole nucléaire serait, à son avis, le résultat de la fixation au sublimé. M. Guillermond, dans une série de mémoires, a étudié à fond la question du noyau des saccharomycètes; il a démontré (8) que le noyau n'est pas composé d'un nucléole et d'une vacuole comme l'a dit M. Wager, mais que le nucléole de cet auteur est le vrai noyau. Il reconnaît que la division est amitotique et qu'elle s'accomplit dans l'isthme des deux cellules. Il a décrit aussi le mouvement du noyau fils destiné à aller dans la cellule fille. Il croyait à l'existence de deux espèces de noyaux, les uns seulement avec un nucléole, les autres avec une structure chromatique, mais, dans un mémoire récent (9), il a démontré que dans chaque cellule on peut mettre en évidence un nucléole et un réseau chromatique. Il a aussi vu des corpuscules qu'il nomme corpuscules métachromatiques, qu'il pouvait facilement distinguer du noyau. Dans deux résumés (10, 11) il a donné une récapitulation complète de la question.

D'autres auteurs ont étudié ce sujet, tels sont : M. Casagrandi (4), qui doute que le noyau se divise par karyokinèse, mais qui est sûr de l'existence d'un noyau; M. Beyerinck (1), qui a vu un noyau dans le *Schizosaccharomyces octosporus*, mais qui ne dit rien de la manière dont il se divise; MM. Buscalioni et Casagrandi (3), qui affirment que le noyau se divise toujours en deux parties inégales, dont la plus grande reste dans la cellule mère, tandis que la plus petite passe dans la cellule fille; M. Feinberg (7), qui nie l'existence d'un nucléole, d'un réseau chromatique ou d'une substance nucléaire, mais qui affirme que le noyau est entouré toujours d'une auréole achromatique, ce qui peut servir à différencier les saccharomycètes de quelques rhizopodes et flagellés, qui leur ressemblent quelquefois; M. Hirschbruch (15), qui a vu non seulement une structure nucléaire, mais aussi une division mitotique et une copulation de deux noyaux, dont l'un se teint en bleu et l'autre en rouge. M. Guillermond (11) ne croit pas qu'on puisse accorder la moindre valeur au mémoire de M. Hirschbruch, vu sa technique imparfaite. Enfin le travail de MM. Raymann et Kruis (26), qui, pour la plus grande partie, traite des bactéries et n'apporte rien de nouveau.

II

TECHNIQUE

Quoique munies d'une membrane assez résistante, les cellules des saccharomycètes sont fort délicates et se contractent facilement, de sorte que la structure devient indistincte ou tout à fait invisible. Il faut donc fixer les cellules avec le plus grand soin, sinon le protoplasme et la vacuole se contractent de la manière la plus fantaisiste, en prenant des formes qu'on pourrait aisément confondre avec des noyaux en division amitotique, tandis que la figure de division réelle est souvent déchirée, de sorte qu'on reçoit une impression tout à fait fausse.

En fixant les cellules on risque : 1° de plasmolyser les cellules. La division nucléaire s'accomplit souvent dans l'isthme de deux cellules et c'est là, précisément, la place où les protoplasmes des cellules mère et fille se séparent à la moindre plasmolyse, comme je l'ai pu démontrer autre part (32); 2° de détruire la structure cellulaire et nucléaire, par des liquides fixateurs imparfaits, même quand ils peuvent passer à travers la paroi plasmatique, ou quand on les emploie à une concentration iso ou hypotonique, de sorte qu'on n'ait pas à craindre de plasmolyse.

Pour éviter le premier danger, il faut employer des fixateurs d'une tonicité égale à celle des solutions de NaCl à 1,75 à 4,68 0/0, selon le substratum sur lequel on a cultivé les cellules. Il s'ensuit qu'une solution concentrée de sublimé peut servir à cette étude. En ce qui concerne la solution de Flemming et celle d'acide picrique concentrée, ces liquides ne sont pas hypertoniques au suc cellulaire des levures. Il est inutile de dire qu'il ne faut jamais dessécher les cellules, fixées ou non. En les séchant à l'état frais, elles se plasmolysent énergiquement; en les séchant fixées, elles se contractent tout de même, la membrane cellulaire n'étant pas assez résistante pour soutenir la cellule. Pour éviter le second danger, on ne saurait donner de règles générales, il faut trouver empiriquement le liquide nuisant le moins à la structure cellulaire et nucléaire.

Je citerai ici quelques-unes des méthodes les plus importantes pour colorer les noyaux des levures.

Une technique très approuvée et fréquemment employée est celle de M. Möller (23, 24). Il ne se servait pas, comme ses pré-

décresseurs, d'une culture pure, mais d'une culture mixte. Il fixait au moyen de la solution d'iode dans l'iodure de potassium, laissait agir pendant quelques minutes, puis faisait dessécher les cellules imprégnées de cette solution pour les coller au couvre-objet, qu'il mettait pendant 24 heures dans la même solution. Puis il lavait à l'eau et à l'alcool dilué et laissait pendant 48 heures dans l'alcool absolu. Après ce temps il colorait pendant 15-30 minutes au violet de gentiane, différenciait à la glycérine diluée et montait dans une solution concentrée de sucre. Plus tard il a modifié cette méthode en fixant d'abord dans la solution ci-dessus mentionnée, puis dans une solution bouillante de glycérine diluée, et en colorant à l'hématoxyline ferrique d'Heidenhain.

M. Raum (25) desséchait les cellules immédiatement, ou après une fixation au sublimé; il colorait au bleu de méthylène de Löffler faiblement chauffé et au brun de Bismarck.

M. Curtis (5), en desséchant lentement à l'air, fixait à l'éther. Il colorait pendant 10 minutes avec une solution de violet de méthylène alcalinisée à la potasse, et lavait ensuite au pyrogallol et à l'alcool. Il se servait aussi de la thionine phéniquée de M. Nicolle.

M. Wager (33) mettait pendant 12 heures les cellules de levure dans une solution concentrée de sublimé, les lavait à l'eau, à l'alcool à 30 0/0, puis à l'alcool à 70 0/0, et enfin à l'alcool méthylique. Une goutte de cette émulsion était étalée sur un couvre-objet, l'alcool presque tout à fait évaporé était remplacé par de l'eau qu'on laissait dessécher. La levure était remise dans l'eau puis colorée au vert de méthyle combiné à la fuchsine ou à l'éosine, ou encore colorée à l'hématoxyline ou à la safranine seule.

M. Hoffmeister (16) a fixé les cellules au moyen de plusieurs liquides. Il eut de bons résultats en se servant du liquide de Rath et de Merkel, de la solution de sublimé et du liquide de Möller. Après la fixation au liquide de Rath, il lavait à l'eau et laissait dessécher les cellules fixées sur un couvre-objet. Il colorait à l'hématoxyline ferrique.

M. Guillermond (10) a employé aussi un grand nombre de liquides fixateurs. En employant la liqueur de Flemming il n'eut pas de bons résultats. Le sublimé et l'alcool à 96 0/0 étaient

préférables, mais les meilleurs résultats furent obtenus en se servant de l'acide picrique et aussi d'une solution picriquée formolée. Cet auteur a essayé un grand nombre d'agents colorants. Impraticables sont le vert de méthyle, la safranine et le carmin. Le rouge de Magenta et la fuchsine valent mieux, mais l'agent colorant le plus convenable est l'hématoxyline ferrique d'Heidenhain.

M. Hirschbruch (15) a décrit une méthode si primitive qu'elle rend ses résultats un peu douteux. Il fixait les cellules comme les bactéries, c'est-à-dire qu'il les desséchait sur un couvre-objet, les flambait et les colorait à la fuchsine. Il différenciait par l'acide sulfurique étendu et teintait le protoplasme au bleu de méthylène. Il est clair qu'au moyen de cette méthode on détruit à fond la structure cellulaire et nucléaire. J'ai préparé des cellules suivant cette méthode, mais les protoplasmes s'étaient tellement contractés qu'on ne put rien distinguer.

On voit donc que plusieurs auteurs ont desséché les cellules en les fixant. Peut-être faut-il attribuer à cela leurs divergences sur l'existence du noyau. En effet, M. Raum, qui niait l'existence du noyau, s'est servi d'une méthode dont on ne pouvait attendre rien de bon, tandis que les auteurs qui ont vu les noyaux ont employé des méthodes plus délicates, quoiqu'ils aient souvent desséché les cellules après la fixation. C'est ce qui les a empêché d'observer les détails plus fins de la structure nucléaire tels que la membrane, le nucléole et le réseau chromatique. Cette dessiccation des cellules est sans doute la cause d'erreurs comme celles commises par M. Wager.

C'est à cause de cette délicatesse des cellules, que j'ai tâché d'éviter de les sécher, j'y suis parvenu de la manière suivante : des cellules d'une culture, sur gélatine au moût de raisin, âgée de vingt-quatre heures, étaient incorporées dans une gouttelette d'une solution de gélatine, se solidifiant à peine à la température de la chambre. Cette dilution fut étalée sur un couvre-objet, en couche mince, au moyen de la tranche d'une carte de visite, comme MM. Laveran et Mesnil l'ont décrit. Le couvre-objet ainsi préparé fut plongé immédiatement dans la solution fixatrice, avant que la couche pût se dessécher. De cette manière on n'avait pas besoin de dessécher les cellules avant la coloration. La gélatine ne gêne pas du tout l'observation, parce qu'elle ne se colore que très faiblement.

J'ai employé comme liquide fixateur, d'abord la solution de Flemming, mais elle avait une action si nuisible sur la structure des cellules et des noyaux que je l'ai rejetée. J'eus des résultats moins mauvais en me servant du sublimé concentré et de l'acide picrique. Mais les meilleurs furent obtenus avec une solution de formaldéhyde à 35 0/0 et avec la solution iodo-iodurée, comme l'a décrite M. Möller. Cependant il y avait toujours des destructions plus ou moins grandes dans le protoplasme, les protoplasmes des cellules filles et mères s'étaient quelquefois séparés les uns des autres. On voit donc que le second danger, que j'ai mentionné plus haut, est beaucoup plus à craindre que le premier. Le sublimé (dont la solution concentrée est isotonique à la solution de 1.47 NaCl 0/0, la solution d'acide picrique et celle de Flemming ne sont pas hypertoniques¹, et cependant elles ne peuvent être employées. Il faut remarquer aussi qu'on ne peut pas mesurer la valeur pratique d'une solution fixatrice, par la grandeur de la contraction qu'elle produit sur le protoplasme, comme l'a fait M. Hoffmeister; en effet, le sublimé et l'acide picrique ne contractent le protoplasme qu'assez faiblement.

Les meilleurs résultats, je les ai obtenus en me servant du mélange de M. Lavdowsky (20) (eau distillée, 20; alcool à 95 0/0, 3; formaldéhyde concentrée, 3; acide acétique glacial, 0,5) ce liquide, quoique contractant encore un peu le protoplasme, ne détruisait pas la structure cellulaire et nucléaire.

J'ai coloré le noyau avec plusieurs agents colorants. La méthode que M. A. Meyer (38) a décrite pour colorer les noyaux des bactéries, n'a pas donné de résultats avec les levures. En employant la méthode décrite par M. Möller dans son premier mémoire, on pouvait distinguer les noyaux, mais on n'y voyait aucune structure et ils n'étaient que peu distincts du protoplasme, le tout ressemblant aux microphotographies de M. Möller. La coloration de Romanowsky ne nous a pas réussi, ce qui n'est pas d'accord avec les affirmations de MM. Ziemann et Zettenow (40-41). Au contraire, au moyen de l'hématoxyline ferrique, j'ai eu de très bonnes préparations, les noyaux noirs se distinguant clairement du protoplasme.

1. La crainte de M. Möller, que le sublimé concentré ne plasmolyse les cellules des levures par son hypertonie, est donc sans cause.

Le liquide d'Ehrlich-Biondi-Heidenhain (13) m'a fourni des colorations encore plus distinctes. Les préparations sur couvre-objet, fixées par la méthode décrite, étaient mises pendant 3 heures dans une solution d'acide acétique glacial à 10,1 0/0, puis on les portait dans la solution colorante diluée à 3/200 et à laquelle on avait ajouté quelques gouttes d'acide acétique à 0,1 0/0. Les préparations restaient dans ce bain pendant 12 ou 18 heures, puis elles étaient lavées à l'eau et au xylène alcool et on montait au baume de Canada.

III

LA DIVISION DES NOYAUX

En étudiant les préparations les mieux réussies, j'ai vu des formes nucléaires qui me firent douter que la division nucléaire des levures fût amitotique, et en les combinant, je suis convaincu que la division est vraiment mitotique. Je décrirai ici les différentes phases de la division karyokinétique.

Le noyau en repos, a une forme ronde, quelquefois un peu aplatie et est situé le plus souvent près de la vacuole. Quand on a coloré soigneusement, on peut y apercevoir une structure chromatique, très irrégulière et ne ressemblant en rien à celle des cellules des plantes supérieures (fig. 26-31). Cette irrégularité n'est peut-être qu'apparente, à cause de l'extrême petitesse de l'objet observé, et il se peut que le noyau des levures ait une structure analogue à celui des autres plantes. Quelquefois on peut apercevoir aussi le nucléole (fig. 26 n.). Ceci est d'accord avec l'observation de M. Guillermond (9), à savoir que le noyau a une structure chromatique et un nucléole. Le noyau étant situé à côté d'une vacuole, on verra souvent ce noyau soit au dessus, soit au-dessous d'elle, et on pourrait croire qu'il est entouré d'une auréole incolore. Je crois qu'il faut expliquer ainsi les observations de quelques auteurs, qui affirment que le noyau est composé d'un corps clair ayant à l'intérieur un corps chromatique, le nucléole (fig. 1 et 4). On ne peut donc s'appuyer sur cette particularité pour distinguer les levures d'autres organismes, comme l'a fait M. Feinberg (1).

La prophase. — Le commencement de la prophase s'annonce

par le fait que le contour du noyau devient de plus en plus indistinct, ensuite la structure chromatique est détruite et on voit sur un fond achromatique, quatre éléments chromatiques : les chromosomes ; mais, vu la petitesse du noyau, il est possible que ce nombre soit inexact ; cependant je n'ai jamais observé un autre nombre de chromosomes. Si réellement ce chiffre de quatre est exact, les levures que j'ai étudiées auraient la même quantité de chromosomes que les Ascomycètes étudiées par M. Maire (38) (fig. 6 et 7).

Les chromosomes se rangent dans l'équateur en forme d'anneau (fig. 13) : Stade mono-aster. Ces anneaux sont très fréquents dans les cellules en plein bourgeonnement, dans les cultures jeunes et vigoureuses. Je ne saurais dire, s'ils sont identiques à ceux que M. Hirschbruch (15) a décrits ; en considérant sa technique, cela me semble tout au moins fort douteux. L'anneau n'a pas une structure homogène, mais semble être composé de différents éléments, que l'on ne réussit pas à compter.

Pendant que les chromosomes se rangent en mono-aster, la linine s'est transformée en fuseau, qu'on ne peut voir cependant qu'assez rarement, parce que le protoplasme ne se colore qu'un peu plus faiblement que la linine. Par conséquence on ne voit le plus souvent rien que l'anneau mono-astrique. Cependant je suis quelquefois parvenu à colorer distinctement le fuseau (fig. 8, 9, 10). Une fois, j'ai vu à son pôle un corpuscule chromatique ressemblant à un centrosome, mais comme je ne l'ai vu qu'une seule fois, je ne puis attribuer de valeur à cette observation.

Quelquefois, l'anneau mono-astrique entoure une partie incolore en forme de fuseau. Peut-être est-ce une vacuole qui est devenue visible par la décoloration de la linine. Ceci est d'accord avec l'observation que j'ai pu faire également, qu'il existe parfois une partie incolore dans l'anneau mono-astrique, de sorte qu'on voit un petit dis que incolore entouré d'un anneau chromatique (fig. 25).

La métaphase. — Les chromosomes se divisent sans doute, pendant qu'ils forment le mono-aster, mais on ne peut le voir. La première chose qui s'offre de nouveau à l'observation, c'est la séparation des chromosomes fils. On peut l'observer facilement,

en regardant l'anneau de côté, de sorte qu'on ne voie qu'une ligne; on observe alors de petites branches, situées aux deux côtés de l'anneau (fig. 14). Enfin les chromosomes se séparent tout à fait et se rassemblent aux pôles du fuseau (la figure 15 montre les chromosomes fils se retirant de l'équateur; malheureusement la linine s'est décolorée, de sorte que la structure du fuseau n'apparaît pas).

Arrivés aux pôles, les chromosomes se réunissent en formant le stade di-aster. A ce moment, on ne peut plus distinguer les chromosomes l'un de l'autre, ils sont disposés en forme de calotte, aux pôles du tonneau nucléaire. Il est remarquable que le tonneau est hétéropolique, cette hétéropolie ne disparaît plus pendant le reste de la karyokinèse, et il s'ensuit que les deux noyaux fils sont aussi inégaux; ceci est d'accord avec les observations de MM. Buscalioni et Casagrandi. Les deux calottes formées de chromosomes, sont unies par de la linine, qui reste quelquefois colorée, mais qui se décolore le plus souvent (fig. 32 et 33). Les formes de tonneau ne sont pas rares, on peut les voir facilement dans de jeunes cultures. Sans doute cette phase de la division est la plus facile à observer, comme l'a déjà remarqué M. Janssens (17); on la rencontre même dans des préparations qui sont desséchées après la fixation.

L'anaphase. — Après le stade di-aster, les chromosomes commencent à se ranger en file. Quelquefois on peut les voir encore séparés (fig. 22). Après que les chromosomes sont déjà réunis en spirème, les noyaux sont encore reliés par un fil de linine assez large. Si la division a eu lieu à une certaine distance du bourgeon, l'un des noyaux fils se sépare de plus en plus de l'autre, toujours uni à lui par le fil de linine, qui s'allonge en devenant de plus en plus mince (fig. 19); enfin ce noyau arrive, en traversant l'isthme, dans la cellule fille. Quelquefois on peut encore voir le reste du fil de linine, adhérent à un des noyaux fils, après que la cellule fille s'est déjà séparée de la cellule mère. Si, au contraire, la division a eu lieu là où la cellule a bourgeonné, le fil de linine reste beaucoup plus court (fig. 24). Si la cellule s'est hypercolorée, ou si (en se servant de l'hématoxyline ferrique) on n'a pas assez différencié, on perçoit une image ressemblant à s'y méprendre à une amitose.

La division nucléaire ne s'accomplit pas en même temps

que celle de la cellule. On observe souvent des cellules où la division se trouve déjà dans la métaphase et où on ne voit rien encore du bourgeonnement.

On voit, par cette description, que la division nucléaire de la levure pressée que j'ai étudiée a quelque ressemblance avec celle du micronucléus des Paramécies, les deux noyaux fils restant également unis, pendant quelque temps, après la division, par un fil de linine, qui peut atteindre une assez grande longueur.

Bibliographie

1. BEYERINCK. — *Schizosaccharomyces octosporus eine achtsporige Alkoholhefe*. *Centralbl. f. Bakt. II*. Bd. XVI, 1894.
2. BRÜCKE. — *Elementarorganismen*. *Sitz. Ber. der k. Abth. der Wiss. Math. Cl. Wien*. XLIV, Abt. II, 1864.
3. BUSCALIONI et CASAGRANDE. — *Sul saccharomyces guttulatus* (Rob.) *nuove osservazioni*. *Malpighia* vol. XII, 1898.
4. CASAGRANDE. — *Über die Morphologie der Blastomyceten*. *Centralbl. f. Bakt. II*. Bd. III, 1897.
5. CURTIS. — Contribution à l'étude de la saccharomycose humaine. *Annales de l'Inst. Pasteur*. T. X, 1896.
6. EISENSCHITZ. — *Über die Granulierung der Hefe*. *Centralbl. f. Bakt. II*. Bd. I, 1895.
7. FEINBERG. — *Über den Bau der Hefezellen und über ihre Unterscheidung von einzelligen tierischen organismen*, 1902.
8. GUILLERMOND. — *Recherches cytologiques sur les levures*. Paris et Lyon, 1902.
9. GUILLERMOND. — Sur le noyau de la levure. *Annales mycologici*. Bd. II, 1904.
10. GUILLERMOND. — Recherches cytologiques sur les levures. *Revue générale de botanique*. Tome XV, 1903.
11. GUILLERMOND. — La morphologie et la cytologie des levures. *Bulletin de l'Inst. Pasteur*. T. III, 1905.
12. HANSEN. — *Comptes rendus du laboratoire de Carlsberg*. Tome II.
13. HEIDENHAIN. — *Über kern und Protoplasma*. 1892, p. 146.
14. HIERONYMUS. *Über die Organisation der Hefezellen*. *Berichte d. deutsch. Bot. Gesellsch.* Bd. XI, 1893.
15. HIRSCHBRUCH. — *Centralbl. f. Bakt. II*. Bd. IX, 1902.
16. HOFFMEISTER. — *Zum Nachweise des Zellkernes bei Saccharomyces* «*Sitzungsber. d. deutsch. naturw. med. Vereins f. Böhmen*». Lotos 1900.
17. JANSSENS. — *Beiträge zur Frage über den kern der Hefezellen*. *Centralbl. f. Bakt.* Bd. XIII, 1893.
18. JANSSENS et LEBLANC. — *Recherches cytologiques sur la cellule de levure*. *La cellule*. Tome XIV, 1898.
19. KRASSER. — *Über das angeblich vorkommen eines Zellkernes in die Hefezellen*. *Oester. Bot. Zeitschr.* 1885.

20. LAVDOWSKY. — *Anatomische Hefte*. Bd. IV, 1894.
21. MAFFUGI et SIRLEO. — *Neuer Beitrag zur Pathologie eines Blastomyceten*. *Centralbl. f. allg. Path. und path. Anat.* Bd. VI, 1895.
22. MARPMANN. — *Über Hefen und über den Zellkern bei Saccharomyceten und Bakterien*. *Centralbl. f. Bakt. II.* Bd. IX, 1902.
23. MÖLLER. — *Über den Zellkern der Hefe*. *Centralbl. für Bakt.* Bd. XII, 1892.
24. MÖLLER. — *Weitere Mitteilungen über den Zellkern und die Sporen der Hefe*. *Centralbl. f. Bakt.* Bd. XIV, 1893.
25. RAUM. — *Zur Morphologie und Biologie der Sprosspilze*. *Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh.* Bd. X, 1891.
26. RAYMANN et KRUIS. — *Des noyaux des bactéries*. *Bull. int. Acad. sciences de Bohême*, 1903.
27. RONCALI. — *Klinische Beobachtungen und histologische und mikrobiologische Untersuchungen über einen Fall von primärem Adenocarcinom (Papilloma infectans)*. *Centralbl. f. Bakt. I.* Bd. XXIV, 1898.
28. STECKSEN. — *Studier öfver Curtis blastomycet fran svuls-etnologisk synpunkt*. *Ref. Centralbl. f. Bakt. I.* Bd. XXIX, 1901.
29. SCHLEIDEN. — *Grundzüge der Wissenschaftliche Botanik*.
30. SCHMITZ. — *Sitz. ber. der Niederrhein. Ges. f. naturw. und med.* 1879. Bonn.
31. STRASBURGER. — *Das Botanische Praktikum*. Iena 1884.
32. SWELLENGREBEL. — *Ueber Plasmolyse und Furgorregulation der Presshefe*. *Centralbl. f. Bakt.* Bd. XIV, n° 12/13.
33. WAGER. — *The nucleus of the yeast plant*. *Annals of Botany*. Vol. XLVIII, 1898. *Ref. Centralbl. f. Bakt. II.* Bd. V.
34. ZACHARIAS. — *Beiträge zur kenntniss des Zellkernes und der Sexualzellen*. *Botanische Zeitung* 1887.
35. ZALEWSKI. — *Über die Sporenbildung in den Hefezellen*. *Verh. und Sitzungsber. der krahauer Ac. der Wiss. Math. sect.* 1886. Bd. XIII. *Ref. Bot. Centralbl.* Bd. XXV.
36. ZIMMERMAN. — *Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle*. Breslau, 1887.
37. NAGELI. — *Zeitschrift für wissenschaftliche Botanik*. Bd. I.
38. MEYER. — *Practicum der Botanischen Bakterienkunde*. Iena 1903.
38. MAIRE. — *Sur la division nucléaire, dans l'asque de la Morille et de quelques autres Ascomycètes*. (*Compt. rend. de la Soc. de biologie de Paris*, 10 mai 1904).
39. MACALLUM. — *Quart. Journal of mier sc.* 1895. Vol. XXXVIII.
40. ZETTNOW. — *Zeitchr. f. Hyg.* 1899. Bd. XXX.
41. ZIEMANN. — *Centralbl. f. Bakt. I.* Bd. XXIV, 1898.
42. DANGEARD. — *C. R. de l'Acad. des Sc. T.* CXVII, 1893.

Explications de la planche XV.

Fig. 1-4. — Noyaux en repos.

Fig. 5-7. — Commencement de la prophase, séparation des chromosomes.

— 8-10. — Mono-aster, fuseau visible.

— 11-12. — Mono-aster avec vacuole au dedans du fuseau.

— 13 et 25. — Mono-aster, fuseau invisible.

— 14-15. — Métaphase. Séparations des chromosomes filles.

— 16-18. — Di-aster, la linine est colorée.

— 32-33. — Di-aster, la linine s'est décolorée.

— 19-20. — Noyaux fils se séparant l'un de l'autre, unis encore du fil de linine.

Fig. 21. — Fil de linine encore adhérent à l'un des noyaux après la séparation des cellules.

Fig. 22. — Anaphase.

— 23. — La division nucléaire s'est accomplie. Commencement de la séparation des noyaux fils.

Fig. 24. — Division dans l'isthme dans le stade de fig. 23.

— 26-31. — Différentes formes de la structure chromatique des noyaux.
n = nucléole.

SUR LE MÉCANISME DU PHÉNOMÈNE DE L'ACTION FRACTIONNÉE DES TOXINES

(*Phénomène de Danysz*)

PAR LE D^r C LEVADITI.

Le mécanisme des processus antitoxiques a été récemment soumis à une étude approfondie par Arrhenius et Madsen¹. Ces savants ont abouti à la conclusion que les poisons microbiens et leurs anticorps, tout en contractant entre eux des combinaisons chimiques analogues aux sels, se comportent les uns vis-à-vis des autres à la façon des bases et des acides faibles. Contrairement à l'opinion soutenue auparavant par Ehrlich, Arrhenius et Madsen affirment que les réactions toxo-antitoxiques sont éminemment réversibles et par suite compatibles avec un état d'équilibre instable ; elles obéissent à la loi des masses établie par Guldberg et Wage. Ces chercheurs sont ainsi conduits à admettre la notion de la constitution simple des sécrétions bactériennes, notion entièrement opposée à la conception pluraliste d'Ehrlich.

Les faits apportés par Arrhenius et Madsen en faveur de leur théorie sont aussi nombreux qu'apparemment démonstratifs. Certains d'entre eux, en particulier l'expérience de Madsen et Walbum², concernant la diffusion des mélanges L₀ de poison diphtérique dans la gélatine solidifiée, semblaient prouver d'une façon irréfutable la nature réversible des réactions toxo-antitoxiques. On était ainsi, à un moment donné, porté à souscrire sans réserve à l'hypothèse avancée par ces savants, lorsque Danysz³ et après lui von Dungern⁴ et Sachs⁵ firent connaître l'existence d'un phénomène commun à la plupart des processus antitoxiques, phénomène qui ne cadre nullement avec la conception de la réversibilité. Voici en quoi consiste ce phénomène :

1. ARRHENIUS ET MADSEN, *Zft. für physikalische Chemie*, vol. XLIV, fasc. I, 1903, p. 7.

2. MADSEN ET WALBUM, *Cbt. für Bakt.*, vol. XXXIV, n° 2, p. 242.

3. DANYSZ, ces *Annales*, mai 1902, p. 331.

4. VON DUNGERN, *Dtsche med. Woeh.*, 1904, n° 8-9.

5. SACHS, *Berl. kl. Woeh.*, 1904, n° 16, et *Cbt. für Bakt.*, vol. XXXVII, fasc. 2, 1904.

Toute combinaison réversible qui intéresse des principes chimiques ayant les uns pour les autres des affinités relativement faibles, est compatible avec un état d'équilibre instable, caractérisé par la présence à l'état libre, d'un excès des divers composants qui prennent part à la réaction. *Cet état d'équilibre est constant pour une quantité donnée de substances réagissantes et ne change guère si, au lieu de faire intervenir ces substances en une seule fois, on les introduit d'une façon fractionnée.* Or, si l'on cherche dans le domaine des réactions toxo-antitoxiques ce dernier caractère des processus chimiques véritablement réversibles (*influence inappréciable du fractionnement sur l'équilibre final*), on s'aperçoit que ce caractère est absent et que ces réactions antitoxiques semblent ainsi vouloir se soustraire à la loi des masses. Danysz, en se servant de la ricine et du poison diphthérique, von Dungern, en expérimentant avec la toxine sécrétée par le B. de Löffler, et Sachs, en employant la tétanolysine, la staphylolysine et le ferment lab, ont constaté en effet, que si on a soin d'ajouter à une quantité donnée d'antitoxine (une IE., par exemple) des fractions multiples de toxine, on diminue sensiblement les valeurs de $L+$, calculées d'après la méthode qui consiste à faire agir l'antigène en une seule fois¹.

La découverte du phénomène du fractionnement a fourni la matière aux objections les plus sérieuses que l'école d'Ehrlich a apportées à la théorie de la réversibilité. Actuellement on doit considérer comme un fait acquis la dissemblance qui existe entre les réactions véritablement réversibles d'une part, et les processus antitoxiques d'autre part, et n'accepter qu'avec réserve l'interprétation suivant laquelle l'effet des *toxones* serait attribuable à la présence des traces de toxine dissociée. Il reste néanmoins à préciser le mécanisme intime du phénomène de Danysz : c'est ce que Arrhenius, Sachs et von Dungern ont essayé de faire dans des travaux parus récemment.

Pour Arrhenius², les changements imprimés par le fractionnement de la toxine aux valeurs de $L+$, sont dus à ce que des *réactions secondaires* interviennent dans le processus de neutralisation antitoxique, réactions qui troublent l'allure générale de

1. Les valeurs de $L+$ expriment l'équilibre final des réactions toxo-antitoxiques.

2. ARRHENIUS, *Zft. für Elektrochemie*, vol. X, n° 35, 1904.

ce processus et qui sont d'autant plus efficaces, que le temps écoulé entre la première et la dernière portion de toxine est plus long. Ce temps doit donc jouer un rôle capital dans la production du phénomène en question; sa réduction à un minimum doit en conséquence, empêcher dans une certaine mesure la production de ce phénomène. Or, von Dungern ¹ à l'aide du poison diphtérique d'une part, Sachs avec la tétanolysine d'autre part, ont prouvé que les effets du fractionnement se ressentent d'une façon appréciable, même dans le cas où l'espace qui s'écoule entre l'introduction des deux portions de poison est très court (deux heures par exemple). L'explication proposée par Arrhenius se trouve donc en contradiction avec les faits fournis par l'observation directe.

Une autre manière de concevoir le mécanisme du phénomène du fractionnement a été avancée par von Dungern et par Sachs ²; la voici :

Suivant l'école de Francfort, les sécrétions microbiennes et en particulier le poison diphtérique, possèdent une constitution des plus complexes, à laquelle prennent part des principes toxiques ou non, dont l'affinité à l'égard de l'antitoxine est plus grande ou inférieure à celle de la toxine. Parmi ces principes, ce sont les *épitoxoïdes* et les *toxones* paralysantes qui se distinguent par la faiblesse de leur avidité antitoxique; par contre, l'affinité des *prototoxoïdes* dépasse sensiblement celle des molécules de la vraie toxine. Les auteurs précités admettent que le temps peut suppléer dans une certaine mesure à la faiblesse de l'avidité antitoxique, en ce sens que si le contact entre les épitoxoïdes, les toxones et l'antitoxine dépasse une certaine limite, l'union entre ces composés et cette antitoxine devient à ce point intime, qu'elle ne peut plus être disloquée par les molécules de la vraie toxine. C'est ce qui arrive, par exemple, lorsqu'on fractionne la quantité L+ de poison que l'on doit ajouter à une IE. pour obtenir un mélange une fois mortel. Dans ce cas, les épitoxoïdes et les toxones de la première portion de ce poison se combinent avec l'anticorps, l'immobilisent, et font que la seconde fraction de toxine ait moins d'antitoxine à sa disposition. De là l'excès de poison libre que l'on constate à la

1. VON DUNGERN. *Zft. für Elektrochemie*, vol. X, n° 40, 1904.

2. Déjà cités.

suite du fractionnement et la diminution des valeurs de $L+$ qui en est l'expression.

Ajoutons que cette interprétation, conséquence immédiate de la complexité des poisons microbiens, a conduit von Dungern à admettre l'existence hypothétique d'un nouveau composant du bouillon diphtérique, *les épitoxonoïdes*.

*
* *

Étant donnée l'importance théorique du phénomène du fractionnement, nous avons essayé de le soumettre à une analyse détaillée et de l'envisager à deux points de vue différents : en premier lieu comme objection à l'égard du prétendu caractère réversible des réactions antitoxiques, et en second lieu, au sujet de son mécanisme intime. Pour ce faire, nous nous sommes servi soit de principes comparables aux toxines et aux antitoxines, mais dont la constitution chimique est bien précisée [$B(OH)_3$ et NH_3 ; *solanine* et *lecithine*], soit de substances diastasiques (*trypsine*) dont l'analogie avec les poisons microbiens est généralement admise à l'heure qu'il est (Roux, Ehrlich, Oppenheimer, Morgenroth, Korschun, etc.) et dont le mécanisme de neutralisation par les antidiastases des sérums normaux nous est relativement connu.

Pour ce qui concerne le premier point, nous avons pu établir dans une série d'expériences entreprises en collaboration avec M. Danysz, que si l'on fractionne la dose de NH_3 qui, ajoutée à une quantité donnée de $B(OH)_3$, forme un mélange hémolytique vis-à-vis des hématies de lapin ($L+$), on ne diminue guère les valeurs de cet $L+$.

Exemple¹ : Constantes... $\left\{ \begin{array}{l} DL \text{ de } NH_3 = 0,1. \\ L_0 = 9,0 B(OH)_3 + 1,0 NH_3 (10 DL). \end{array} \right.$

TABLEAU I

$L+$	
En une fois.	Fractionné.
1.4	1.4

1. La solution de NH_3 qui nous a servi était normale, celle de $B(OH)_3$ demi-normale. Nous avons employé comme dissolvant l'eau salée isotonique.

Ceci prouve que *le phénomène de Danysz ne peut être reproduit lorsqu'on se sert de principes qui se neutralisent réciproquement en observant la loi des masses et qui donnent des combinaisons réellement réversibles*. On doit donc rejeter définitivement la manière de voir d'Arrhenius et Madsen, d'après laquelle les vraies réactions antitoxiques qui réalisent au plus haut degré ce phénomène, seraient identiques au processus de neutralisation qui s'opère entre NH_3 et $\text{B}(\text{OH})_3$.

D'un autre côté, nous avons pu prouver que le phénomène en question n'apparaît que lorsque le poison appartient à la catégorie des corps qui, par leur constitution, se rapprochent plus ou moins des matières protéiques, tels que les sécrétions microbiennes non cristallisables, les diastases, etc. En effet, si l'on essaye d'engendrer ce phénomène avec la solanine (action hémolytique sur les hématies de lapin), en employant comme anticorps soit les sérums normaux (lapin ou cheval), soit la lécithine¹, on obtient des résultats négatifs.

Le phénomène du fractionnement semble donc ne pouvoir être réalisé qu'à l'aide de principes dont la constitution chimique éminemment complexe, se rapproche de celle des matières protéiques.

*
* *

En ce qui concerne le second point, à savoir la précision du mécanisme du phénomène de Danysz, nous pensons qu'il serait erroné de considérer ce mécanisme comme étant unique, quels que soient le principe actif et l'anticorps dont on se sert. Ainsi, un bon nombre de données nous ont montré que, du moins pour ce qui se rapporte à la *trypsine* et à la *streptocolysine*, l'interprétation proposée par von Dungern et par Sachs est loin d'être conforme aux faits expérimentaux. Cette interprétation exige que la toxine (dans notre cas la trypsine) ait une constitution complexe; qu'elle renferme par exemple, en dehors des composants ayant une affinité donnée vis-à-vis de l'anticorps, des modifications toxoidales douées d'une avidité antitoxique plus faible. Or, la trypsine dont nous nous sommes servi² se comporte à ce point de vue

1. Nous avons constaté que la lécithine (Poulenc), en solution concentrée dans de l'eau salée isotonique, exerce une action antihémolytique accentuée vis-à-vis de la solanine (chlorhydrate de solanine à 0,1 0/0 : hématies de lapin).

2. Nous avons expérimenté avec deux échantillons de trypsine provenant de la fabrique Merk.

différemment du ferment lab (Korschun ¹), en ce sens que, d'une part, il est impossible de discerner dans ses molécules un complexe haptophore distinct du groupe zymophore ², et que, d'autre part, la différence entre L+ et L₀ est, pour la plupart du temps, égale ou sensiblement rapprochée d'une DL. Néanmoins, et malgré cette absence de trypsinoïdes à faible affinité, analogues aux épitoxoïdes et aux toxones du poison diphtérique, la trypsine réalise le phénomène de Danysz, si on a soin d'employer comme anticorps soit le sérum normal de lapin, soit celui du cheval ³.

Exemple : Trypsine Merk, en solution dans de l'eau salée isotonique (2 et 4 0/0) filtrée à travers la bougie Berfeld. Action liquéfiante sur 10 c. c. de gélatine à 10 0/0. Le volume de la diastase seule, ou des mélanges de sérum et de diastase est ramené à 4 c. c. Temps de digestion : 2 heures à 38°. Solidification de la gélatine à 14° pendant 30 minutes.

TABLEAU II

Expérience N°	L +		
	En une seule fois.	Fractionné (22 heures d'intervale).	D exprimé en DL.
I.....	1.5	1.35	0.75
II.....	1.95	1.5	2.25
III.....	1.1	0.8	3.0

L+ varie d'une expérience à l'autre, d'après le sérum employé et la concentration de la trypsine. D signifie la différence entre L + fourni par l'expérience dans laquelle la trypsine a été ajoutée en une fois, et L + du fractionnement. Cette différence est exprimée en doses liquéfiantes (DL).

1. KORSCHUN, *Zft. für physiol. Chemie*, vol. XXXVII, 1903, p. 366.

2. La trypsine en solution dans de l'eau physiologique s'atténue sensiblement vers 71° et surtout vers 73° (son pouvoir digérant diminue de 7 fois et 1/2 environ). Or, cette destruction du groupe zymophore s'accompagne d'une altération parallèle du complexe haptophore. Le pouvoir neutralisant de la trypsine atténuée par la chaleur, vis-à-vis de l'antitrypsine normale, marche de pair avec ses qualités digestives. Il n'y a pas de production de protrysinoïdes, analogues aux proagglutinoïdes.

3. Ces études ont porté sur les propriétés gélatinolytiques de la trypsine. Elles concernent donc exclusivement la *gélatinase* et ne présument en rien quant aux qualités protéolytiques de la *protéase*. On sait, en effet, que d'après certains auteurs, entre autres Pollak (*Hofmeisters Beitr.*, vol. 6, page 95), il y a lieu d'admettre l'existence, dans les extraits pancréatiques, d'une enzyme gélatinolytique différente du ferment protéolytique.

Ces faits prouvent que si l'on se sert de principes diastasiques dépourvus de composés analogues aux toxones et aux toxoïdes, et possédant très vraisemblablement une constitution simple, on réussit quand même à réaliser le phénomène du fractionnement : *La constitution complexe de la toxine n'est donc nullement une condition sine qua non de ce phénomène.*

De plus, il résulte de nos recherches que le phénomène de Danysz peut manquer ou être peu marqué dans le cas où on opère avec des poisons microbiens caractérisés par leur richesse en principes analogues aux épitoxoïdes et aux toxones ($L_+ - L > 4DL$). Tel est par exemple le cas de la *streptocolysine*, comme il résulte de l'exemple suivant :

Exemple : Streptocolysine préparée d'après le procédé de Besredka (Bouillon additionné de sérum inactivé de cheval. Cultures de 24 heures filtrées à travers la bougie Berkefeld.) On emploie comme antily sine le sérum de cheval.

$$\text{Constantes.} \dots\dots\dots \left\{ \begin{array}{l} DL = 0,2. \\ L_0 = 0,4 \text{ lysine} + 4,5 \text{ sérum.} \\ L_+ - L_0 = 6 DL. \end{array} \right.$$

$$L_+ \text{ en une seule fois} = 1,6. \quad L_+ \text{ fractionné} = 1,6 \text{ (}^1\text{)}.$$

Ce fait mérite d'être enregistré, quoique, regardé de près, il ne saurait être considéré comme une objection à l'adresse de l'interprétation proposée par von Dungern et par Sachs. Il suffit, en effet, d'admettre que les épitoxoïdes et les toxones de la streptocolysine, à l'encontre de ceux du poison diphtérique, sont incapables de contracter avec l'antitoxine une combinaison intime et durable, pour expliquer la raison d'être de l'absence du phénomène du fractionnement dans le cas de la streptocolysine.

Mais ce qui, à notre avis, est en complet désaccord avec cette hypothèse, c'est le fait suivant : si l'on opère avec la trypsine et le sérum normal de lapin ou de cheval, et si l'on a soin de maintenir les mélanges L_0 pendant cinq heures à 38° , on constate *la transformation spontanée de cet L_0 en L_+ .*

Exemple : a) La quantité de sérum de lapin capable de neutraliser 1,0 de la solution de trypsine à 2 0/0, augmente avec le temps de séjour des mélanges à 38° .

1. Parfois D atteint des valeurs voisines de 4 DL.

TABLEAU III

Séjour à 38° :	L ₀	L+
1 heure 40.....	1,0 Tr. + 1,4 Sér.	1,0 Tr. + < 1,3 Sér.
6 heures.....	1,0 Tr. + 1,8 Sér.	1,0 Tr. + 1,6 Sér.
22 heures.....	1,0 Tr. + > 1,8 Sér.	1,0 Tr. + 1,8 Sér.

b) *Transformation spontanée de L₀ en L+ à 38°*

Des mélanges constitués par 1,0 de trypsine et par des quantités croissantes de sérum de lapin, sont maintenus sous une couche de toluol¹ pendant 2, 6 et 23 heures à 38°. Ce temps écoulé, on décante le toluol et on verse ces mixtures sur 10 cm.c. de gélatine; on prépare à ce moment des mélanges témoins qui ne séjournent pas au thermostat. Digestion pendant 2 heures; solidification de la gélatine à 14° pendant 15 minutes.

TABLEAU IV

Sérum.	Trypsine.	2 h., 38°.	6 h., 38°.	23 h., 38°.	Témoin.
1.5	1.0	0	Complet	Complet	0
1.6	1.0	0	Complet	Complet	0
1.8	1.0	0	0	Complet	0
2.0	1.0	0	0	Complet	0

Ces données montrent qu'un mélange de trypsine et d'anti-trypsine absolument incapable de liquifier la gélatine, peut se transformer en un liquide actif², après un séjour suffisamment prolongé à 38°.

Ce changement de L₀ en L+, s'opérant sans que le fractionnement de la diastase intervienne, est, avons-nous dit, en contradiction avec l'hypothèse avancée par von Dungern et par Sachs. Voici en quoi consiste cette contradiction. Il résulte de la définition même que, dans L₀, tous les constituants hypothétiques de la trypsine, ceux qui possèdent une forte avidité pour l'antidiastase comme ceux qui ont une affinité plus faible, doi-

1. Le sérum seul maintenu sous une couche de toluol à 38°, ne devient pas gélatinolytique.

2. L'activité protéolytique d'un tel mélange L₀ ayant séjourné à 38° est due à de la trypsine libre, comme le prouvent nos expériences concernant l'influence exercée par le chauffage sur cette activité. Ce mélange perd son pouvoir gélatinolytique à la même température que la trypsine pure (73°-75°).

vent être entièrement neutralisés par cette antidiastase. La transformation spontanée de L_0 en une mixture liquéfiante $L+$ ne saurait donc s'expliquer par l'intervention des épitoxoïdes ou des toxones, pour le simple motif que ceux-ci étant déjà unis à l'anticorps, sont incapables de défaire la combinaison entre la trypsine et cet anticorps, et mettre ainsi en liberté cette trypsine. Il faudrait pour cela que, pendant le séjour à 38° , il y eût un accroissement dans l'avidité antidiastasique des toxones et des épitoxoïdes de la trypsine, chose peu admissible, si l'on pense que cet accroissement ne devrait nullement intéresser l'affinité anti-enzymatique des molécules de la vraie trypsine.

La transformation spontanée de L_0 en $L+$ peut être mise en évidence d'une façon différente, en employant par exemple la méthode de la diffusion dans la gélatine solidifiée¹, proposée par Madsen et Walbum pour l'étude de la toxine et de l'antitoxine diphtériques. Des expériences entreprises dans cette direction nous ont montré, en premier lieu, qu'il suffit de porter pendant quelques heures à 38° un mélange inactif de trypsine et de sérum, pour que ce mélange, versé ultérieurement sur une couche de gélatine solidifiée et placé à la glacière, laisse diffuser au bout de peu de jours de la trypsine active dans cette gélatine. En second lieu, ces recherches ont permis de voir que, même à basse température (glacière), et à la condition que la durée du contact soit suffisamment longue, les mixtures L_0 réussissent à imprégner cette gélatine d'une quantité de trypsine capable de produire une liquéfaction prononcée, après une courte digestion à 38° .

Cet ensemble de faits prouve qu'au moins pour ce qui concerne le cas de la trypsine et de l'antitrypsine des sérums normaux, le phénomène du fractionnement, ainsi que la transformation spontanée de L_0 en $L+$, sont loin de pouvoir s'expliquer grâce à l'hypothèse des principes à avidité antitoxique faible. On est ainsi porté à rechercher une autre interprétation du mécanisme de ce phénomène, qui ne soit pas basée sur la notion de la constitution complexe des substances actives qui prennent part à la réaction (diastases ou toxines). Voici celle à laquelle nous nous sommes arrêté.

¹ L'expérience a été faite dans de petits flacons à fond plat; on réalise ainsi une grande surface d'absorption.

*
* *

L'influence entravante que l'antitrypsine des sérums normaux exerce sur la digestion de la gélatine par la trypsine est très vraisemblablement due au fait suivant : Au cours de la réaction, la diastase doit choisir entre les protéïdes du sérum, principes faciles à attaquer grâce à la petitesse de leurs particules colloïdales, et la gélatine, dont la digestibilité est rendue plus difficile, à cause du volume relativement considérable de ses corpuscules colloïdaux. Il va de soi que dans ces conditions, l'enzyme commencera son action hydrolysante par les matières protéïques du sérum et ne s'attaquera aux colloïdes gélatineux que lorsque ces matières protéïques auront été plus ou moins modifiées.

La preuve en est fournie par le fait que toute diminution imprimée à la digestibilité des protéïdes de l'antitrypsine, amène avec soi l'affaiblissement du pouvoir antidiastatique de cet anticorps. C'est le cas par exemple du chauffage à 60°, lequel provoque l'augmentation du volume des particules colloïdales du sérum (état louche, visibilité de ces particules à l'ultra-microscope), en même temps que l'amointrissement de la force anti-enzymatique de ce sérum.

Ainsi, dans le processus antidiastatique qui nous occupe, nous avons l'avantage de connaître, d'une façon presque certaine, la manière dont l'anticorps met une entrave au fonctionnement spécifique de la diastase. Nous savons qu'ici la diastase non seulement contracte une liaison intime avec le principe empêchant, mais que, de plus, elle agit d'une façon directe sur ce principe, en lui imprimant des modifications physiques et chimiques plus ou moins profondes.

Or, c'est dans cette influence directe de l'enzyme sur l'anti-enzyme que réside, d'après nous, la raison d'être du phénomène du fractionnement.

Soit un mélange neutre constitué par a de trypsine et une IE de sérum normal (L_0) maintenu en présence d'une quantité donnée de gélatine pendant un temps t à 38°. Cette gélatine ne sera pas liquéfiée, pour le motif que dans le temps t l'enzyme, après avoir contracté une liaison avec l'antidiastase, sera entièrement occupée à protéolyser les particules colloïdales de cette

antidiastase. Ajoutons dans une autre série d'expériences, à la même dose 1E de sérum, la même quantité a de trypsine, mais cette fois en deux portions $a/2$, espacées l'une de l'autre par le temps nt , et plaçons le tout à 38° . Dans ces conditions, la première fraction $a/2$ de diastase agira sur les protéïdes du sérum pendant ce temps plus long nt , et aura ainsi le loisir de détruire une quantité d'anticorps sensiblement plus grande que dans le cas où cette fraction n'agirait que pendant le temps t . Il résulte de là que la seconde portion $a/2$ de trypsine trouvera moins de principe empêchant à sa disposition, de sorte que le mélange final contiendra fatalement une certaine quantité de diastase libre. Si l'on ajoute à cela que la première fraction d'enzyme, après avoir agi sur les albumines du sérum, se régénère et vient ainsi augmenter la masse de substance protéolysante libre, on conçoit plus facilement encore pourquoi le fractionnement provoque une diminution sensible dans les valeurs de $L +$ et la transformation spontanée de L_0 en $L +$.

Il découle de ces considérations que le phénomène de Danysz peut s'expliquer dans certains cas, grâce à l'influence destructive que la toxine exerce sur l'antitoxine. Ce phénomène est alors dû à ce que la première portion de principe actif (diastase ou toxine) réussit, pendant le temps plus ou moins long qui la sépare de l'addition la seconde portion, à détruire une certaine quantité d'anticorps et fait que cette dernière fraction trouve moins de substance empêchante à sa disposition que lorsque le mélange est réalisé en une seule fois. C'est là une manière de voir qui cadre parfaitement avec la transformation spontanée de L_0 en $L +$ et qui s'applique d'elle-même à nos expériences concernant la diffusion des mélanges de trypsine et de sérum normal dans la gélatine solidifiée. Elle se trouve corroborée par la constatation suivante : le chauffage du sérum antitrypsique normal à 60° détermine, en même temps qu'une diminution de la digestibilité de ce sérum et de son pouvoir anti-enzymatique, un amoindrissement sensible des facultés grâce auxquelles ce sérum réalise le phénomène du fractionnement. Ceci prouve que la production de ce phénomène est sous la dépendance de la digestibilité du sérum antitrypsique, conclusion qui découle de notre hypothèse¹.

1. Le phénomène de Danysz apparaît-il lorsque, contrairement à ce qui se



Ce serait trop s'avancer que de tirer des faits que nous avons exposés dans ce mémoire une conclusion générale et d'affirmer que dans toutes les réactions antitoxiques où apparaît le phénomène de Danysz, ce phénomène est attribuable à l'influence destructive exercée par l'analogue de la toxine sur l'analogue de l'antitoxine. Tout ce que l'on peut dire, sans crainte d'être contredit, c'est qu'il existe un certain nombre de ces réactions où l'interprétation de von Dungern et de Sachs n'est pas applicable, en ce sens que la genèse du phénomène du fractionnement ne semble pas être sous la dépendance de la constitution complexe des toxines (ou des diastases). Or, dans certaines de ces réactions, en particulier celle qui s'opère entre la trypsine et l'antitrypsine normale, l'influence détériorante imprimée par le principe actif sur l'anticorps, nous apparaît précisément comme étant des plus vraisemblables.

A cela on peut ajouter que dans l'étude du mécanisme du phénomène de Danysz, on doit tenir compte non seulement des caractères de la toxine, mais aussi des propriétés de l'antitoxine. Nous avons vu, en effet, que le chauffage du sérum antitrypsique à 60°, en imprimant des changements dans l'état physique des colloïdes qui entrent dans la constitution de ce sérum, modifie l'allure générale du phénomène de Danysz. De plus, il résulte d'un travail récent de Pick et Schwoner¹ que ce phénomène est, dans le domaine de la toxine et de l'antitoxine diphtériques, sous la dépendance de la richesse en IE des sérums antitoxiques dont on se sert. Ces auteurs ont vu, par exemple, que les sérums riches en unités immunisantes réalisent le phénomène du fractionnement, alors que les sérums pauvres en ces unités, mis en contact avec la même toxine, sont incapables de provoquer l'abaissement des valeurs de L +, lors du fractionnement du poison.

On peut conclure de là que *l'apparition du phénomène de* passe pour la trypsine et l'antitrypsine normale, c'est l'anticorps qui exerce une influence destructive sur le principe actif? Une combinaison qui réponde à ces desiderata est difficile à trouver dans le domaine des toxines. Nous n'avons pu la réaliser qu'à l'aide de diastases et nous avons jugé par analogie. La gélatine qui, ajoutée au sérum frais de cheval, ne provoque aucun changement visible,

1. PICK et SCHWONER, *Wien. kl. Woch.* 1904, n° 40.

Danysz dépend des propriétés inhérentes à la fois à la toxine et à l'antitoxine et que, dans certains cas, l'influence destructive exercée par le premier de ces principes sur le second est la seule raison d'être de ce phénomène.

précipite fortement le même sérum dilué et chauffé à 60°. Dans ce cas, le chauffage augmentant le volume des particules colloïdales renfermées dans le sérum, facilite l'agglomération de ces particules par les colloïdes de la gélatine. Cette action précipitante exercée par la gélatine (*analogue à la toxine*) sur le sérum chauffé (*analogue à l'élément sensible*), est entravée par la trypsine (*analogue à l'antitoxine*). Cette dernière empêche la précipitation en protéolysant la gélatine; elle imprime ainsi des modifications dans l'état physique des colloïdes gélatineux (diminution de volume) et fait que ces colloïdes ne provoquent plus l'agglomération des particules colloïdales du sérum chauffé. Il résulte que dans la combinaison dont il est question, l'analogue de l'antitoxine (trypsine) agit d'une façon destructive sur l'analogue de la toxine (gélatine); cette combinaison est donc l'inverse de celle réalisée par la trypsine et l'antitrypsine normale.

Or, nos expériences nous ont montré que ce système est incapable de réaliser le phénomène de Danysz. Ceci est une preuve indirecte en faveur de l'hypothèse que nous avons avancée à propos du mécanisme de ce phénomène.

Note ajoutée aux épreuves. — La précipitation du sérum chauffé de cheval par la gélatine liquéfiée, est à rapprocher de celle réalisée par Henry et Cernovodano (*C. R. de la Soc. de Biologie*, 1905), à l'aide de l'hydrate ferrique et du sérum neuf préalablement soumis à une influence thermique qui détruit les propriétés cytasiques de ce sérum.



